



(f) Int. Cl.⁶:

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



PATENT- UND MARKENAMT

® Offenlegungsschrift

_® DE 198 19 846 A 1

(2) Aktenzeichen:

198 19 846.9

(2) Anmeldetag:

5. 5.98

(3) Offenlegungstag:

11. 11. 99

C 07 K 16/00 A 61 K 39/395 C 12 N 15/63 // G01N 33/569, 33/574

(7) Anmelder:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

(14) Vertreter:

Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea Schüßler, 81825 München

② Erfinder:

Little, Melvyn, 69151 Neckargemünd, DE; Kipriyanov, Sergej, 69121 Heidelberg, DE

68 Entgegenhaltungen:

wo 91 19 739 CA 119:157915a: CA 126:130370a;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- Multivalente Antikörper-Konstrukte
- Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der Fy-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F_v-Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v-Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V_{H^-} und zwei V_{L^-} Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, 10 wobei eine Bindungsstelle aus einer V_{H^-} und einer V_{L^-} Domänen ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen.
Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit
F_v-Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig
in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F_v-Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F_v-Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10–30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v-Antikörper-Konstrukt mit anderen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d. h. multivalentes, F_v-Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F_v-55 Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden 60 sind.

Der Ausdruck "F_v-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt" 65 weist auf einen F_v -Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt

mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzelkettigen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F_v-Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F_v-Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d. h. es ist hi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d. h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0–10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOII-Rest einer der variablen Domänen und dem NH₂-Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3-10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige Fv-Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen Fv-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11-20 Aminosäuren, insbesondere 15-20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz (G₄S)₄, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1–5 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke "F_v-Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3 × 19-IL, pDISC3 × 19-SL, pPiC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

3

- (a) ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein ersindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen 10 über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu 15 binden. Das erfindungsgemäße F_v-Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden. Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tunnor-Erkrankung, gesehen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F_v-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His₆: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3 \times 19-LL und pDISC3 \times 19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird, His₆: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PeIB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen 35 Pectatlyase (PeIB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_I : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-LL. 6 × IIis: Sequenz, die für sechs C-termi- 40 nale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGIy-Dipeptid kodiert, das die V_{II}- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (GIy4Ser)₄-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pcl-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-SL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für βpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 crkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, 60 die für ein GlyGIy-Dipeptid codiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGI-yProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; 65 V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete

1

Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-LL kodierten bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs Cterminale Histidinreste kodiert; PeIB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19- SL kodierten tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. cmyc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs Cterminale Histidinreste kodiert; PeIB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des Saccharomyces cerevisiae-α-Faktor-Sekretionssignals; V_H: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-I æadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des Saccharomyces cerevisiae-α-Faktor-Sekretionssignals; V_H: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele er-

Beispiel 1

Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pIIOG-αCD19 und pIIOG-dmOKT3, welche für die scF_v-Fragmente codieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov et al., 1996, J. Immunol. Meth. 196, 51-62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov et al., 1997, Protein Eng. 10, 445-453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F_v-Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V_H-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GIy-Gly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAG-GAGAAATTAACC, und DP2, 5'- AGCACACGATAT-CACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGC, (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit EcoRI und EcoRV gespalten und mit dem mit EcoRI/EcoRV linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pIIOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V_L-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für ein c-myc-Epitop und einen Hexahistidinylschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCA-

10

CACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAAC-TCCA, und DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACACA-GATCTTTAGTGATGGTGATGTGAGTTTAG-G, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit HindIII und Xbal gespalten und mit dem durch HindIII/Xbal linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG 5'-TATAentweder Li-1. TACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACCAC CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCC-AGAACCACCACCACCAGCGCCGCAGCATCAGCC-CG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (GIy4Ser)4-inter- 15 scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGCGACCCTGGGCCAC-CAGCGCCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3 × 19-LL 20 und pDISC3 x 19-SL wurden durch Ligierung des Ncol/ PvuII-Restriktionsfragments aus pHOG 19-3, umfassend das Vektorgerüst und die NcoI/PvuII-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. 25 tetravalenten Fv-Antikörper-Konstrukte sind in den Fig. 5 bzw. 6 angegeben.

Beispiel 2

Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Hefe

(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZaA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe Pichia pastoris wurde als Ausgangsmaterial ver- 40 wendet. Er enthält ein Gen, das für das Saccharomyces cerevisiae α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, ZeocinTM, der sowohl in Pichia als auch in E. coli bifunktionell ist. Das Gen, das für 45 das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3 × 19-SL unter Verwendung der Primer 5-PIC, CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAG-CAGTCTGGGCTGAACTGGC, und pSEXBn GGTCGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit EcoRI und XbaI gespalten und in mit EcoRIIXbaI linearisiertes pPICZaA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequen- 55 zen des tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

(B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZoA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3 × 19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZOA wurde mit EcoRI gespalten, Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines 65 Klenow-Fragments der E. coli-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit Xbal gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde

isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3 × 19-LL mit Ncol gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit Xbal wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten Fy-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten Fy-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

Beispiel 3

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F"-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

E. coli-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3 × 19-LL bzw. pDISC3 × 19-SL transformiert worden waren, wurden über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2×YT_{Ga}) bei 37°C gezüchtet. 1:50-Verdünnungen der Übernachtkulturen in 2×YTGA wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD600-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2×YT-Mediums, das 50 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCI, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1 stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g. 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine im-Metallaffinitätschromatographie (IMAC) mobilisierte wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu2+ beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, cluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976, Anal. Biochem., 72, 248 254) unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten Fv-Antikörper-Konstrukte wurden aus den A_{280} -Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{lmg/ml} = 1,96$ bzw. 1,93 bestimmt. 30

40

Beispiel 4

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe Pichia pastoris

Kompetente P. pastoris GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 pg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit Sacl linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 pg/ml ZeocinTM enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände 20 wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

Beispiel 5

Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F_v -Antikörper-Konstruktes

(A) Größenausschlußehromatographie

Eine analytische Gelfiltration der F_v-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 μl/min 35 bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

(B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3+/CD19 -akute-T-Zell-Leukämielinie Jurkat und die CD19+/-CD3--B-Zellinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5×10^5 Zellen in 50 µl RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggestein, 45 Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 µl der Fy-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 µl 10 µg/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 ul des FTTC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewa- 55 schen und in 100 µl 1 µg/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszens der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton 60 Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

(C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zellinie 65 Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und

1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO2 inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Py-5 ruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard[51Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2 × 106 Zielzellen wurden mit 200 μCl Na[51Cr]O₄ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2× 105/ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5 x 106/ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CILs in 100 µl wurden auf 104 Zielzellen/Vertiefung in 50 µl titriert. 50 µl Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angesetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. 100 µl des Überstands wurden gewonnen und auf [51Cr]-Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: (experimentelle Freisetzung - spontane Freisetzung)/(- maximale Freisetzung - spontane Freisetzung) × 25 100.

Patentansprüche

- 1. Multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
- 2. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0–10 Aminosäuren aufweisen.
- F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.
- F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.
- 5. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11–20 Aminosäuren aufweist.
- F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz (G₄S)₄ aufweist.
- F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.
- 8. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3–10 Aminosäuren aufweist.
- F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.
- F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
- 11. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
- F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
- 13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1–12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird.

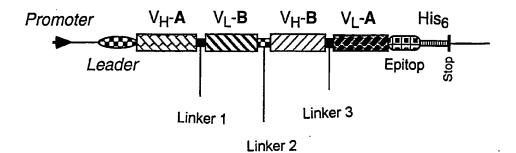
1	•	1
1	ı	

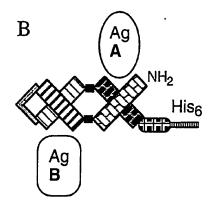
9	
4. Expressionsplasmid, kodierend für das multiva- ente F _v -Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprü- he 1-12.	
5. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich DISC3 × 19-LL.	
6. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich DISC3 × 19-SI	
7. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich PIC-DISC-LL.	
8. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich	1
PIC-DISC-SL. 9. Verwendung des multivalenten F _V -Antikörper-	
Construktes nach einem der Ansprüche 1–12 zur Dia- nose und/oder Therapie von Erkrankungen. O. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Erkran- ungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen ind.	
Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen	•
	•
	2
	?
	4
	4
	•

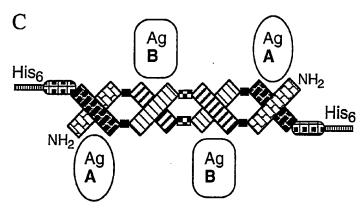
Offenlegungstag:

DE 198 19 846 A1 C 07 K 16/00 11. November 1999

A







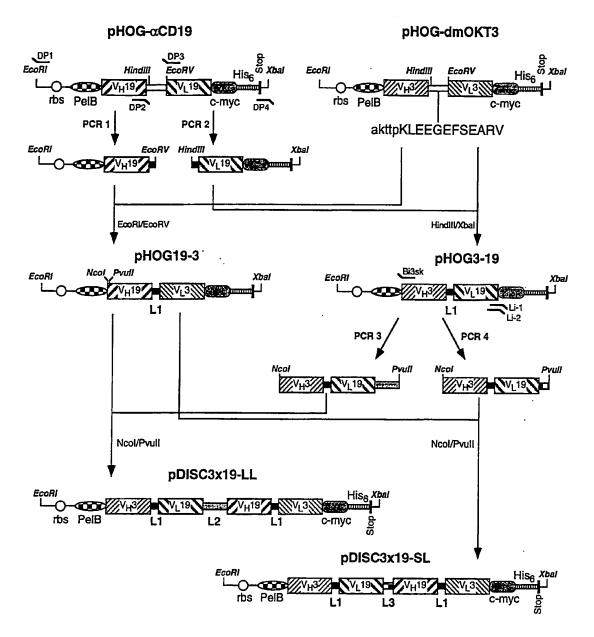
Nummer: Int. Cl.6:

C 07 K 16/00

Offenlegungstag:

11. November 1999

DE 198 19 846 A1



Linkers:

L1 = GG

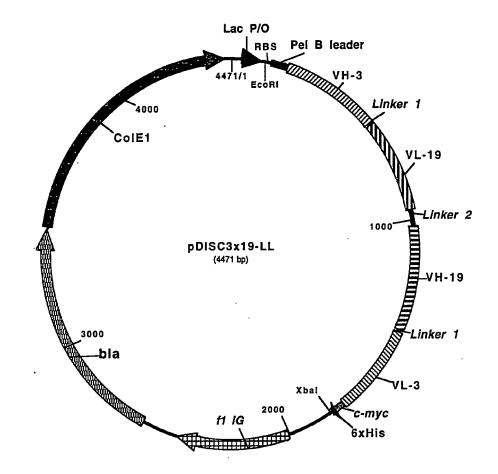
 $L2 = (G_4S)_4$

L3 = GGPGS

FIGUR 2

Offenlegungstag:

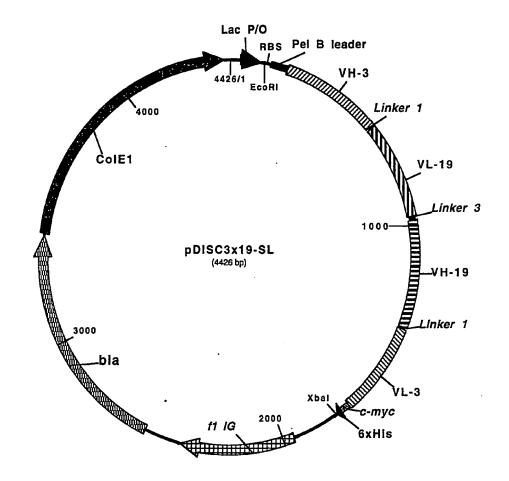
DE 198 19 846 A1 C 07 K 16/00 11. November 1999



FIGUR 3

Offenlegungstag:

DE 198 19 846 A1 C 07 K 16/00 11. November 1999



FIGUR 4

DE 198 19 846 A1 C 07 K 16/00

Offenlegungstag:

11. November 1999

EcoRi RBS PelB leader Nool
EcoRI RBS PelB leader Ncol 1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGCCACCTCAGCCGCCATCG
1) M K Y L L P T A A A G L L L L A A O P A M
◆ Frame-H1 VH anti-CD3
92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC
22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 183 TAGGTACACGATGCACGCTGGAAAACAGAGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGA <u>TACATTAATCCTAGCCGTGGTTATAC</u>
52 RYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYT
Frame-H3
267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC
80 NYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLT CDR-H3 Frame-H4
354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGA <u>TATTATGATGATGATCA</u> TTAÇAGC <u>CTTGACTACTGCGCCACACCACCCCCC</u> A
109 SEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTL
CH1 · Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19
440 CAGTCTCCTCACCCAAAACAACACCCAACCTTGGGGGTGATATCTTGCTCACCCAAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTCTCTAGGCCAGA
138 T V S S A K T T P K · L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q CDR-L1 Frame-L2
530 GGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAAGGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC
168 RATISC'K AS QS V D Y D G D S Y L, N W Y QQI P G CDR-L2 Frame-L3
614 ACCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCCACCCA
196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F
CDR-L3 Frame-L4 702 CACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGT <u>CAGGAAGGTAGTGAGGAT</u> CCGTGGACGTTCGGTGGA
225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G
Ckappa Not! Linker 2
790 GCCACCAAGCTGGAAATCAAA <u>CGCGCTGATGCT</u> GCGCCCCCTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGCGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGC
255 GTKLEIKRADAAAGGGGSGGGGGG
255 G T K L E I K R A D A A A A G G G G S G G G S G G G G Pvull Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTGGGGCCTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGG
Pvull Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGTGGGCTGCAGCTGCAGCAGCTCTGGGGCTGAGCCTGGGCCTGGGCCTGAGCTTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGG 283 S G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCCTGGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGG 283 S G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCCTGGGCCTGGGCCTGAGGATTTCCTGCAAGG 283 S G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGGCTATGCATTCAGTAGGTAGTGGATGGATGGGCTGGGACAGGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGACAGAGTTTGGC
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCCTGGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGG 283 S G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
PvuII Frame-H1 VH anti-CD19 874 **TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTCTGGGGCTGAGCCTGGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGAGATTTCCTGCAAGG 283 **S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 **CTTCTGCCTATGCATTCAGTAGCTAGCTGGATGAGCTGGACGGCCTGGACAGGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTGGC 312 **A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W Pstl Frame-H3 1049 **CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGGTAAAGCCACTGCAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACA
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCCTGGGCCTGAGCCTGCAGGAGATTTCCTGCAAGG 283 S G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTAGTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W Psti Frame-H3
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGCAGCTGCAGCTGCAGCAGCTCTGGGCCTGAGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGAGATTTCCTCCAAGG 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W Psti Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGAGCGAATCCTCCAGCACAGCCTACA 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y CDR-H3 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTTGCGCTCTATTTCTGCCAAGAGGGGAGACTACGACGGCTTATTACTAT
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGCAGCTGCAGCTGCAGCAGCTCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGAGATTTCCTCCAAGG 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W Psti Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGAGCGAATCCTCCAGCACAGCCTACA 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y CDR-H3 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGGGGAGCTACGAGCGGTTAGTACTATT 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y
PVUII Frame-H1 VH anti-C119 874 TCCGGTGGTGGTGGCAGCTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGAGCATTTCCTCCAAGG 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGGTAAACTGGGTGAAGCAGGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W Psti Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGAGAATCCTCCAGCACAGCCTACA 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y CDR-H3 1133 TGCAACTCAGCACCCTAGCATCTGAGGACTCTTCCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGGAGCTTACGAGGAGGCGGTTATTACTAT 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGCAGCTGCAGCTGCAGCAGCTCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGAGATTTCCTCCAAGG 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W Psti Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGAGCGAATCCTCCAGCACAGCCTACA 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y CDR-H3 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGGGGAGCTACGAGCGGTTAGTACTATT 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y
PVuII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTCTGGGGCTGAGCCTGGTGAGCCTGGTGAGCATTTCCTCCAAGG 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTCGCTATCCATCAGTAGCTAGCTAGTGGATGAACTTGGGCTGAACCAGGCCTGGACAGGCTCTGAGTGGACAGATTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W PStII Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGGTAAACCCACCTCTGACTGCAGACGAACCACCCTACA 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y CDR-H3 1133 TCCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTCCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGGAGCTTAGGACGGTTAGTGCACAGCCTTACTAT 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y Frame-H4 1219 GCTATGGACTACTGAGGACCTCAGCCCTCCCCGTCTCCTCAGCCCAAACCACCCCTAGCCGGGGGGTGATATCGTGCCTCACTC 398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T VL anti-CD3 CDR-L1
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTCTGGGGCTGAGCCTGGTGAGCCTGGTCAGTGAAGATTTCCTCCAAGG 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGCCTATCCATCAGTAGCTAGCTAGTGGATGAACTGGGTGAAGCAGGCCTGGACAGGGCTTGAGTGGACAGATTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W PStI Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGGTAAAGCCACCTCTGACTGCAGAGGAATCCTCCAGCACAGCCTACA 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D B S S S T A Y CDR-H3 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGGGAGCTTAGGACGGTTAGGGCCGTTATTACTAT 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y Frame-H4 1219 GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACTCAGGCGTCAAGCAGACCTCCAAGCTTGGCGGGTGATATCGTGCCTCACTC 398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T VL anti-CD3 CDR-L1 1307 AGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCCAAGGTGTAAGTTAAGTTACATGTGGCGAAACTAGCTCAAGTTTAGCTTCAGGGGGAGAAGTTAGCTCAAGTTTAGCTTCTCAGCCAAACTTGGCGGTCAATGTTACTAGTGGCTCAATGTCACTCCAGCCCAAACCAACC
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTCTGGGGCTGAGCCTGGTGAGCCTGGTCAGTGAAGATTTCCTCCAAGG 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGCCTATCCATCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGGCCTGGACAGGTCTTGAGTGGACAGATTTGGCAGAGATTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W PStI Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGGTAAAGCCACCTCTCACTGCACAGAGAATCCTCCAGCACAGCCTACA 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D B S S S T A Y CDR-H3 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGGAGACTACGACGGTTAGGCCGTTATTACTAT 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y Frame-H4 Linker 1 Frame-L1 1219 GCTATGGACTACTGCGGTCAAGGAACCTCAGCCGTCAACACCCCAAGACAACCACCCAAGCTTGGCGGTGATATCCGTCCACTC 398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T VL anti-CD3 CDR-L1 1307 AGTCTCCAGCAATCATCTCGCGTCATCTCCCGGGGAGAGGTCACCATGACCTCCAGCTCAAGTTTACTAGTGCAAGACTCCAGCCTCAAGTTTACTAGTGCAAGCTCAAGTTTACAAGTTACAAGTTTACAAGTTACAAGTTTACAAGTTTACAAGTTACAAGTTTACAAGAACAACAACAACAACAACAACAACAAAAAAAA
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGCAGCTGCAGCTGCAGCAGCTCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGAGCATTTCCTCCAAGG 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGGTGAAGCAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W Pstl Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGGTAAAGCCACTCTGACTGA
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGCAGCTGCAGCTGCAGCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGGCCTGGTGCAGGAGATTTCCTGCAAGG 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 962 CTTCTGGCTAGTCAGTAGCTACTGGGTGAAGCTGGGTGGAAGCGGGTCTGAGTGGATTGGCAGGAGATTTGGC 312 A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W Pstl Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGAGAATCCTCAGCACAGCCTACA 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D B S S S T A Y CDR-H3 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGAGACTACGAAGCAGGTAGGCCGTTATTACTAT 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1 1219 GCTATGGACTACTGCGGTCAAGGAACCTCAGTCACCTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCAAGCTTGGGGTGATATCGTCCTCACTC 398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T VL anti-CD3 CDR-L1 1307 AGTCTCCAGCAATCATCTGCGATCTCCAGGGGAGAGGTCACCCATGACTGCAGGTGAAGTGTAAGTTACATGACTGG 427 Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3 1393 TACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACAACTCCAAACTGGGCTGAGTCCCTCACTTCAGGGGCA 456 Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G CDR-L3
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874. TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTGGGCTGGTGAGGCCTGGTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGG 283) S G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962. CTTCTGGCTAGTCAGTCAGTAGCTACTGGAAGATGGAAGAGCTGGAAGAGCGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGA
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGCCAGGTGCAGCTGCAGCTGGGGCTGGGCCTGGGGCCTGGGGCCTGGAGAATTTCCTGCAAGG 283) S G G G G S Q V Q L Q Q S G A B L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGCCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGGGCCTGGACAGGGCTGGACAGGGTTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGC 312) A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W PSII Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGGTAAAACCACCTCTGACTCCAGCAGAATCCTCCAGCACAGCCTACA 341) P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D B S S S T A Y CDR-H3 1133 TGCAACTCAGCAGCCTTGCATCTGAGGACTCTGCGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGGAGAACTCCTCAGCACAGCCTTACTATACTAT 369) M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1 1219 GCTATGGACTACTGCGGTCAAGGAACCTCAGTCACGCCTAAAACAACACCCAAACTTGGGGGTAATACTGCCTCACTC 389) A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T VL anti-CD3 CDR-L1 1307 AGTCTCCAGCAATCATGCTCCCAGCGGGAAAAGGACCCCAAGCTCGAGACTCAAACTGGGGTAAACTGGAGACTCAATGGAGCGGAAACTGGACTCAAGCTCAAACTGGAGACTCAAGCTCAAACTGGAGACTCAACTGGAGACTCACTGGGGGAAAACTACACCCAAACTTGAGGTGAACTCACTGGGGCAAAACTACACCCAAGCTTAACTTGAGGGGCAAACTGGAGTCACTCGCAGAACTCATGAACTGGAGTCACTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTCCAGGAGAACTCAACTGGAGTCAACTCCAAGCAACTCATGAACTGGAGTCACTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTCCAAGAACTGGAGTCACTCCTCCACAAAACAACCCCAAAACTAGATGAACTCCACTCCCCCAAAAACAACCCCAAACTGGAGTCCACTCCCCCCAAAAACAACCCCAAACTCATGACCTCCACTCCCCCAAAAACAACCCCAAACTCATGACCTCCACAAACAA
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTGGGCGTGGCTGGGCCTGGTCCCAGTGAAGATTTCCTCCAAGG 283) S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGGCTATCCATCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTTGGCCAGAGTTTGGC 312) A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W PStl Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACCAATGGAAAGTTCAAGGGTAAACCCACCTCTGACTGA
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGCCAGGTGCAGGTGCAGGCTGCAGGCTGGCCGGGCTGCCCAGTGAAGATTTCCTCCAGGC 283) S G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGCGTATCCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGC 312) A S G Y A F S S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W PStI Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGTAACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGAGAATCCTCAGCACACCCTACA 341) P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y CDR-H3 1133 TGCAACTCAGCACCTGAGCACCTGAGGACCTCTGAGGACCAACCTCTGACTGCAGAGGATTACTCCAGCACACCCTACA 369) M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R R Y Y Y Frame-H4 1219 GCTATGGACTACTGCGGTCAAGGACCTCAGGCTCACTCCAGCCAAACACCTGCACCACACCTTGACTCACCCACC
PVUII Frame-H1 VH anti-CD19 874 TCCGGTGGTGGTGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTGGGCGTGGCTGGGCCTGGTCCCAGTGAAGATTTCCTCCAAGG 283) S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2 962 CTTCTGGCTATCCATCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTTGGCCAGAGTTTGGC 312) A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W PStl Frame-H3 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACCAATGGAAAGTTCAAGGGTAAACCCACCTCTGACTGA

DE 198 19 846 A1 C 07 K 16/00

Offenlegungstag:

11. November 1999

	Eco			RBS						ader														Nc	
1	GAA'	FICA	TTAA	AGAC	GAG	TAAL																			
										Y	Ĺ	LE	T	Α.	A. A	G	L					Q	P	A	M
92	œœ	محی	מ מייבי	CALCA.	איייאני	C-17C-		me-H		~~~	~ N N ~	المرجلة	~~~	~~~~	CTIC:		······		ant			~~		~~~	
	A (
44.	·		H1		~ ~	-	rame					-	G ,	1 3	٧	Λ.		CDR-		~	· .		1 1		1
183	TAG			ATG	CAC					GCCI	CCAC	'ACCC	тстс	GAATI	ጥፋንድ	тсса				ממיי	AGC	CGT	'GGT	ייי איי	יאמי
521		Y											L												
								•			rame	-	_		_	-	_	-		_	_	•••	•	-	-
267	TAA	TTA	CAA	PCAG	AAG	TTC	AAG	GAC.	AAG	3CCA	CATT	GACT	ACAG	CAA	TCC:	ICCA	GCAC	AGCC	TAC	ATG	CAAC	TGA	GCAG	CCT	GAC
80)	N	Y	N	Q	K	F	K	D	K	A	T L	T	T I	K	S	s	s T	A	Y	M	Q	L.	s s	L	T
													CDR-								me-l				
	ATCI																								
109	S	E	D .			Y	Y	C I					D		Y :	5 1	ם	Y	W	G					Ĺ
440	CAGI	****	ועיאוב	_	H1	יאמרי	.~~	A P.CY	-		er 1		Fram		י אריי	\ \^	CC NC	~		~~			i-CD		NC3
	TV																								
	• •		_	21)R-L1		-	G		-			¥	•			-	^		.me-i		,	2
530	GGGC	CAC	ATC	ICCI	GCAA				LAA	3TG1	TGA	TTAT	GAT	GGTG	ATA	GTT	ATT	[GAA	CTG	GTA				CAG	GAC
168	R A	T	I	S	C .K	Ā	. s	Q	2 - 2	٦ ،	7 0	Y	D	G	D	S	Y I	. N	i w	Y	Q	Q	r	P	G
								CDF									e-L3								
	AGCC																								
196	Q P	Þ	K	L :	L I	Y	D	A	S	И	L	V	S	G I				S	G	S	G				F
702	CACC	~~~	ימים	TYPE	m~~m	~~~	מכיאר	ויייטע	מ ביציעו	·m~~	ו מיטיטת	·~~	ישראר	~~~~		DR-L		משמא	ccz	mac	~~~		me-L		~~x
225													H												
525	•	~	••		•		kaopa			Not		• •		er 3	-	¥	•		Pvu				e-H1		G
790	GGCA	CCAA	GCT	GAA.	ATCA							TGG				rcac	יצטמי								CCT
255▶	G	m 1															-								
	-	T F	ĹŢ	E	I :	K F	λĄ	D.	A	A	A A		G							Q			G A	A E	
	VH	ant	i-CD	19			• •					A. G	G	P	G	s	Q V	' Q }-H1	L	-	Q	s	Fram	ie-H	L 2
	VH GGTG	ant AGGC	i-CD CTG	19 GTC	CTCA	GIGA	AGA	TTTC	CIG	CAA	GCT.	A. G	G CTAT	P GCAT	G TCAG	S T <u>ag</u>	Q V CDF CTAC	Q R-H1 ETGG	L ATC	AAC		S GTG	Fram AAGC	ie-H:	CGC GGC
879 284▶	VH GGTG	ant AGGC	i-CD CTG	19 GTC	CTCA	GIGA	AGA	TTTC	CIG	CAAC	GCT:	A. G	G	P GCAT	G TCAG	S T <u>ag</u>	Q V CDF CTAC	' Q }-H1	L	AAC		S GTG	Fram	ie-H:	CGC GGC
284	VH GGTGD V	ant AGGC R	i-CD CTG(P (19 3GTC 3 S	CTCA: S	giga V	AGA'	TTTC	CTG	CAAC K CDR	GCT A -H2	A. G ICTGO S G	G CTAT	P GCAT A	G ICAG F S	S T <u>ag</u> S	Q V CDF CTAC Y	Q R-H1 ETGG W	L ATC M	AAC N	Q <u>C</u> TGC W	s GTG V	Fram AAGC K	ie-H: TAGA Q	L 2 GGC R
284) 968	VH GGTG	ant AGGC R ACAG	i-CD CTG(P (19 SGTC S S	CTCA S AGTG	GIGA V GATI	AGA' K	TTIC I S	CTC C	CAAC K CDR	GCT A H2 CCT	CTGG S G	G CTAT Y ATGG	P GCAT A TGA	G TCAG F S	S T <u>ag</u> S	Q V CDF CTAC Y	Q R-H1 ETGG W	L ATC M	AAC N	Q <u>C</u> TGC W	s GTG V	Fram AAGC K GGT	ie-H: TAGA Q	L 2 GGC R GCC
284) 968	VH GGTG V CTGG	ant AGGC R ACAG	i-CD CTG(P (19 GTC G S CTTG L I	CTCA S AGTG	GIGA V GATI I	AGA K CGGA G	TTIC I S	CTC C	CAAC K CDR	GCT A H2 CCT	CTGG S G	G CTAT Y ATGG	P GCAT A TGA	G TCAG F S	S T <u>ag</u> S	Q V CDF CTAC Y	Q R-H1 ETGG W	L ATO M GGA	AAG	Q CTGC W	S CTG V	Fram AAGC K GGT	ie-H: Paga Q Paga	L 2 GGC R GCC
968 314 1051	VH GGTG V CTGG P G	ant AGGC R ACAG Q	i-CD CTGC P (GGTY G	19 GGTCG G S CTTGA L I	CTCA S AGTO E W Frame	GTGA V GATT I 9-H3	AGA' K TOGA! G	TTTC I S CAG	CCTC ATT I	CAAC CDR TGG W	A H2 CCT(P	CTGG S G EGAG G	G CTAT ; Y ATGO D O	P GCAT A STGA D GCCT	G TCAG F S TAC! T	S T <u>ag</u> S F <u>aa</u> N	Q V CDF CTAC Y CTAC Y CTAC Y	Q RH1 ETGG W AATG N	L M GGA G	AAG K	Q CTGC W F F TAT	S V ZAAC K	Fram AAGC K G G G	ie-Hi Paga Q Paaa K K	E L GGC R GCC A
968 314 1051	VH GGTG V CTGG P G	ant AGGC R ACAG Q	i-CD CTGC P (GGTY G	19 GGTCG G S CTTGA L I	CTCA S AGTO E W Frame	GTGA V GATT I 9-H3	AGA' K TOGA! G	TTTC I S CAG	CCTC ATT I	CAAC CDR TGG W	A H2 CCT(P	CTGG S G EGAG G	G CTAT ; Y ATGG D G	P GCAT A STGA D GCCT	G TCAG F S TAC! T	S T <u>ag</u> S F <u>aa</u> N	Q V CDF CTAC Y CTAC Y CTAC Y	Q RH1 ETGG W AATG N	L M GGA G	AAG K	Q CTGC W F F TAT	S V ZAAC K	Fram AAGC K G G G	ie-Hi Paga Q Paaa K K	E L GGC R GCC A
968 314) 1051 342)	VH GGTG V CTGG P G ACTC	ant AGGC R ACAG Q TGAC L T	i-CD CCTGC P (CGTX G CTGC/ A A	19 GGTCG G S CTTGG L I AGACG	S AGTOX E W Frame EAATO E S	GIGA V GATI I 9-H3 CCIC S S	AGA K CGGA G CCAG	TTTC I S CAG Q CACA T	ATT I LGCC A	CAAC CDR TGG W TAC	A H2 CCTC P ATGCA M (CTGG S G GGAG G ACTC	G CTAT Y ATGG D G	P GCAT A STGA D GCCT S L	G TCAG F S TAC: T AGCA A Fra	S T <u>AG</u> S TAAC N TCTX S me-H	Q V CDF CTAC Y TAC Y CACCE E I	Q RH1 ETGG W AATG N	L M GGA G	AAG K GTC	Q W F F TAT	S V AAG K	Fram AAGC K G G GTG C	ie-H; Zaga Q Zaaa K Caac A E	CC A SAC N
968 314 1051 342 1142	VH GGTG V CTGG P G ACTC T	ant AGGC R ACAG Q TGAC L T CD	i-CD CCTGC P (GGTX G TGC! A R-H3	19 GGTCG G S CTTGG L I AGACC D	S AGTG E W Frame GAAT E S	GIGA V GATI I 9-H3 CCIC S S	AGA K TOGA G CAG S	CAG Q CACA T	ATT I LGCC A	CAAC CDR TGG W TAC Y	AH2 CCTC P ATGCA M (A G CTGG S G EGAG G ACTG	G CTAT Y ATGG C AGCA S GACT	P GCAT A GTGA CTC S L ACTC	G TCAG F S TAC: T AGCA A Fra GGGT	S TAG S FAAC N TCTC S me-H	Q V CDF CTAC Y CTAC Y CAGGE B I 44 GGAA	Q RH1 TEGE W AATO N CTC:	L M GGA G IGCG A	AAG K K CTC V	Q ETGG W F F TAT Y	S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	Fram AAGC K G G G TGTGX C	PAAA PAAA K CAAC A E CCCA	C L 2 C C C C C C C C C C C C C C C C C
968 314) 1051 342)	VH GGTG V CTGG P G ACTC T	ant AGGC R ACAG Q TGAC L T	i-CD CCTGC P (GGTX G TGC! A R-H3	19 GGAC	S AGTOX Frame FAATO E C GGTI V	GTGP V GATT I 9-H3 CCTC S S	AGA K TOGA G CAG S	TTTC I S CAG Q CACA T Y	ATT GCC ACC ACC ACC ACC ACC ACC	CAAC CDR TGG W TAC Y	AH2 CCTC P ATGCA M (CTGG S G S G SGAG G ACTG L SATGG	G CTAT Y ATGG D CAGCA S GACT	P GCAT A GTGA CTGA S CTGA CTGA S CTGA S CTGA C C CTGA C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	G TCAG F S TAC: T AGCA A Fra GGGT	S TAG S FAAC N TCTC S me-H	Q V CDF CTAC Y CTAC Y CAGGE B I 44 GGAA	Q RH1 TEGE W AATO N CTC:	L M GGA G IGCG A	AAG K K CTC V	Q ETGG W F F TAT Y	S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	Fram AAGC K G G G TGTGX C	PAAA PAAA K CAAC A E CCCA	C L 2 C C C C C C C C C C C C C C C C C
968 314) 1051 342) 1142 372)	VH GGTG V CTGG P G ACTC T GGGI R I	ant AGGC R ACAG Q TGAC L T CD AGAC	i-CD CTGC P (CGTX G TGCL TGCL A R-H3	19 GGACC	SAGTICAL STAGTICAL STAGTIC	GIGA V GATI 1 9-H3 CCIC S S LGGG G	AGA K CGGA CCAG CCAG R	CAGA CACA T Y Frai	ATT AGCC A TA TA TA TA TA TA TA TA T	CAAC CDR TGG W TAC TAC Y	ATGCA A VI	CTGG S G GGAG ACTG ACTG M ATGG	G CTAT Y ATGG AGCA S GACT D ti-CD	P GCAT A GCCT S L ACTC Y W 3	G TACT T AGCA A Fra GGGT	S TAG S TAAC N TCTX S me-H TCAA	Q V CDF CTAC Y CTAC Y GAGGE B II 4 GGAAA G	AATO	L M GGA G ICCC A AGTV	AAG K XGTC V CACC	Q ETTC F F TAT Y	S V R R TTCT F	Fram AAGC K G G GTGX C A	EAAA Q LAAA K CAAC A E CCAA	EAC A H1
968 314 1051 342 1142 372	VH GGTG V CTGG P G ACTC T GGGI R I	ant AGGC R ACAG Q TGAC L T CD AGAC Z T	i-CD CCTGC P (C GCTX G TGC! TGC! TAC! TAC!	19 GAGACO GAGACO L GAGACO T L CTTG	CTCAM S AGTOX Frame GAATO E V Inker GCGG	GIGA V GATI 19-H3 CCTC S S LGGC G I	AAGA' K CGGAG CCAGC S CCGT R	CAGA CACA T CACA T Frai	ATT I AGCC A TTA Y me-l	CAAC CDR TGG W TAC TAC Y CTA	ATGCI M (F CGT(P TGCI M (TGCI VI	GEGAG GEGAG ACTO ACTO ACTO ACTO ACTO ACTO ACTO ACTO	G CTAT Y ATGG D GCAA	P GCAT A GCCT S L ACTC Y W 3 TCATC	G TCAG F S TACT AGCA A Fra GGGT GGGT	S TAG TAAC N TCTC S me-l- TCAA	Q V CDF CTAC Y CACCE B II	AATO ACTO	L AGGA AGTY V CGAG	N AAG K CGTC V CACC T	Q CTCC W FTTC F TAT Y CCIC	S V LAAC K TTC: F TCC: S	Fram AAGC K G G G C C C C C C C C C	EAAA Q EAAA K CAAC A E CCAAC A I	EL 2 GGC R GGC A GGC A H1 AAA K
968 314 1051 342 1142 372	VH GGTG V CTGG P G ACTC T GGGI R I	ant AGGC R ACAG Q TGAC L T CD AGAC P	i-CD CCTGC P (C GCTX G TGC! TGC! TAC! TAC!	19 SGTCA SGAGACA D GAGACA T Li CTTGA	CTCAM S AGTOX Frame GAATO E V Inker GCGG	GIGA V GATI 19-H3 CCTC S S LGGC G G	AAGA' K CGGAG CCAGC S CCGT R	CAGA CACA T CACA T Frai	ATT I AGCC A TTA Y me-l	CAAC CDR TGG W TAC Y CTA Y L1 ACTO	ATGCI M (F CGT(P TGCI M (TGCI VI	GEGAG GACTO L ACTO M ACTO M ART TOCA	G CTAT Y ATGG D GCAA	P GCAT A GCCT S L ACTC Y W 3 TCATC	G TCAG F S TACT AGCA A Fra GGGT GGGT	S TAG TAAC N TCTC S me-l- TCAA	Q V CDF CTAC Y CACCE B II	AATO ACTO	L AGGA AGTY V CGAG	N AAG K CGTC V CACC T	Q CTCC W FTTC F TAT Y CCIC	S V LAAC K TTC: F TCC: S	Fram AAGC K G G G C C C C C C C C C	EAAA Q EAAA K CAAC A E CCAAC A I	E L 2 GGC R GGC A GGC A H1 AAA K
968 314 1051 342 1142 372	VH GGTG V CTGG P G ACTC T GGGI R I	ant AGGG R ACAG Q TGAC CD AGAC P CD	i-CD P (CTGC) P (GGCTX GGCTX GGCTX GGCTX A R-H3 R-H3 T A A A A A A A A A A A A A A A A A A	19 SGTCA SCTTGA AGACA D GACA T Li CTTGA	S AGTO E W Frame EAATO E S GGTZ GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	GIGP V GATT I 9-H3 CCTC S S S AGGG G 1	AAGA K CCAG CCAG R R TATO	CAGA Q CACA T Y Frai	ATT I AGCCC A PTA Y me-l	CCAMC CCDR TGG W TACF Y CTA* Y 1 ACTC T	ATGCI A VI CGTI P VI CGCI A VI CAGTI Q S	GEGAG ACTO ACTO ACTO ACTO ACTO ACTO ACTO ACTO	G ATGG AGCA S SACT D GCAA A	P GCAT A GCCT S L ACTC Y W 3 TCATC	G TCAG F S TAC: T AGCA A Fra GGGGI G	S TAG TAG N TCTC S me-l- TCAA Q GCAA A	Q V CDF CTAC Y CTAC Y CACCE B I 44 GGAA G CTCCC S I	Q RH1 ETGG W AATT N ACTC: CCTC T S CCTC C G	L ATG G A AGT V GGAG E	NAAG K V CACC T	Q ETGC W F TAT Y V CGIC V	S CONTROL	Fram AAGC K GGGT G C A ICAG S	IE-H: PAGA Q CAAC K CCAAC A E CCCCA A CCCCA CCCCA CCCCCCCCCC	EL 2 GGC R GCC A SAC NH1 SAAA K
968 314 1051 342 1142 372 1226 400 1316	VH GGTG V CTGG P G ACTC T GGGI R I	ant ACAGA CACAGA P CD	i-CD CCTGC P (GGCTC GGCT GGCTC GGCT GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCT GGCTC GGCT GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCT GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCT GGCT GGCTC GGCTC GGCT GGCT GGCTC GGCTC GGCTC GGCTC GGCT GGC	19 GACACC L GACACC T L CTTG L CTTG L CTTG L CAAGACC	S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	GIGP V GATTI I P-H3 CCTC S S S LGGC G I	AAGA' K CCAGA CCAGA R TATT	CACA CACA T Y Fran CGIG	ATT I AGCC A TTA Y me-l CCTC L	CCAAC CCBR TGG W TACF Y CTA Y ACT T	A ATGC! A ATGC! M (A CAGTC A	A G CTCCCC CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	G GCTAI Y ATGG ATGG AGCA S GCAA A GAAGG A GAAGG A GAAGG A	P GCAT A GCCT S L ACTG Y W 3 3 I CAGC I CAGC	G TCAG F S TACT T AGCA A Fra GGGGT G GTCT S	S TAGE TAGE N TCTC S me-l- TCAA Q GCAA A	Q V COPE	Q RH1 RH1 W AAATC N ACTC S CCTC G G AAAACC G G AAAAACC	L SATO M GGA G A AGTY V GGAG E	AAG K CACC T CACC T CACC	Q CTGC W FTAT Y CGGC V TTAT	S V LAAG K TTCT F TCC S ACCI	Framanaco K GGGT G C A TCAG S	IE-H: PAGA Q CAAC CAAC CCCA A CCTC	EL 2 2 GGC R GCC A
968 314) 1051 342) 1142 372) 1226 400) 1316 430)	VH GGTG V CTGG P GACTC T GGGGI R I CAAC T T GTGC S A	ant AGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	i-CD CTGC P (GGGTX G GTGC/ AAG TTAC K R-L1 GTCC S	19 GGTCC CTTG L GAGCC T Li CTTG L AAAG S	STCAM S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	V GATTI I I I I I I I I I I I I I I I I I I	AAGA K G G CCAGG S CCGGT R TATC Y L3	CAGA CACA T Y Frai CGIG	ATT I AGCC A TTA Y me-l CCTC L	CCAACACACACACACACACACACACACACACACACACA	A H2 CCTC P ATGCI M (TGCT A VI ACAGTC Q S Fram Y	A. G S S G G G G G A CTC	G GCTATI G Y ATGG AGGA S S SIACT D GCAA A GAAGG K	P GCAT A GCCT S L ACTG Y W 3 TCATC I M TCAGC S C C C C C C C C C C C C C C C C C C	G TCAG T T AGCA A Fra GGGGT G S GGCAO	S FITAGE N TOTAL S me-l- TOTAL Q GCCAN A CTCCC	Q V COPPER CONTROL OF COPPER CONTROL OF COPPER COPP	Q AH1 W AATCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	L A GGA A A C C C C C C C C C C C	AAG K K CGTC V CACC T KAAG K GAT	Q CTCC W FTTAT Y CGTC V TTTAT Y	S CGIG V LAAC K TTCT S ACCA T	Fram AACC K GGGT C C TCAC S TCAC T	HE-HISTAGA Q CAAC CAAC A CCCA CCCA CCTC CCTC S	L 2 2 GGC R GGC A H1 AAA K K GCA K
968 314) 1051 342) 1142 372) 1226 400) 1316 430)	VH GGTG V CTGG P GACTC T GGGA T T GTGC S ACTC ACTC ACTC ACTC ACTC ACTC ACTC A	ant AGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	i-CD CTGC P (GGGTX G GGGTX A R-H3 TAC K R-L1 GCTC S	19 GGTCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	STCAM S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	V GATT I 9-H3 CCTC G G 1 AGGC G 1 AGGC S ame-	AAGA K : CCAGA CCAGA CCAGA R R TATO Y L3	TTTC	ATT I AGCCC A TTA Y me-l CTC L	CCAACACACACACACACACACACACACACACACACACA	A VI CAGACAY Y CAGACAY Y CAGACAY Y CAGACAY Y CAGACAY Y CAGACAY A CAGACAY Y CACACAY Y C	A G CTGG S G GGAG G AACTC ATGGG M ATGGG M C C AGGA ACTC AGGA ACTC AGGA ACTC AGGA AGGA	G CTAT Y ATGG D C CAGCA S D D C CACCA A G C C C C C C C C C C C C C C	P GCAT A GCCT S L ACTG Y W 3 TCAT I M TCAG S C CCTCT	G TCAG F S T T AGCA A Fra GGGGT S GCAC GCAC TTAC	S TTAG S TCTC S Me-l- TCAA Q CCCAA A CTCCC S	Q V CDF CTAC Y Y EAGC Y EAGC E E I CCCCA P TCAC	Q AH1 W AATCCCCC N ACCCCCC S CCCCCC G AAAAA K F AAATCC AAATCC AAAACC	L AGGA G G A AGTY V CGGAG E EATGGAG R AGGAG A CGGAG A CGGAG A CGGAG A CGGAG CGGA	N AAG K V CACC T GAT GAT GAT GAT GOCI	Q CTCC W FTTAT Y CGTC V TTAT Y ATGG	S GGIG V LAAC K TTCT S ACCA T CGAC D	Framanacci K K GGGGT C C TCAG S TCAG TCAG T	HE-HISTAGA Q CAAC CAAC A CCCA T CCTC CDI S AAGA	L 2 2 GGC R GGC A H1 AAAA K CCA K CCA K TGC
968 314) 1051 342) 1142 372) 1226 400) 1316 430)	VH GGTG V CTGG P GACTC T GGGA T T GTGC S ACTC ACTC ACTC ACTC ACTC ACTC ACTC A	ant AGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	i-CD CTGC P (GGGTX G GGGTX A R-H3 TAC K R-L1 GCTC S	19 GGTCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	S AGTGA S WAGTGA E W Frame EAATT E S GGTI V Inker GCGG V Frame	GTGF V GATTI I SCCTC SS S LGGG G 1 17GA S E S ame-	AAGAAR K COGAGA G COCAGA G COCAGA R R TATATA Y L3 TOCAC H	TTTC	ATT I AGCCC A TTA Y me-l CTC L	CCAACACACACACACACACACACACACACACACACACA	A VI CAGACAY Y CAGACAY Y CAGACAY Y CAGACAY Y CAGACAY Y CAGACAY A CAGACAY Y CACACAY Y C	A G CTGG S G GGAG G AACTC ATGGG M ATGGG M C C AGGA ACTC AGGA ACTC AGGA ACTC AGGA AGGA	G CTAT Y ATGG D C CAGCA S D D C CACCA A G C C C C C C C C C C C C C C	P GCAT A GCCT. S L ACTCS 3 3 TCATCATC I M ICAGC S C CCTCT I S	G TCAG F S T AGCA A Fra GGGGT S GCAO FTAC Y	S TTAG S TOTA N TOTA S Me-H TCAA Q CTCC S	Q V CDF CTAC Y Y EAGC Y EAGC E E I CCCCA P TCAC	Q AH1 W AATCCCCC N ACCCCCC S CCCCCC G AAAAA K F AAATCC AAATCC AAAACC	L AGGA G G A AGTY V CGGAG E EATGGAG R AGGAG A CGGAG A CGGAG A CGGAG A CGGAG CGGA	N AAG K V CACC T GAT GAT GAT GAT GOCI	Q CTCC W FTTAT Y CGTC V TTAT Y ATGG	S GGIG V LAAC K F TCC S ACCM T TGAC D CAGGG E	Frammanacc K GGGTT G C C TCACC M T CTGACA A E CTGACA CT	HE-H: ACAACA CCAACA CCCCA A I CCCCCA CCCCCC CCCCC S AAAAAAAAAAA	L 2 2 GGC R GGC A H1 AAAA K CCA K CCA K TGC
968 314> 1051 342> 1142 372> 1226 400> 1316 430> 1401 458>	VH GGTG V CTGG P G ACTC T GGGZ R I GTGC S A ACTC L	ant ACAGO P CO CCAGO A	i-CD CCTGCCP P (GGTYCGC) G G TTGCCI N AACC K R-L1 SCTCC S	19 GGTCG L GGAC T L CAAG CGAC GGAC GCAC	S AGTON S WE Frame EAATV V INKER GG	GTGP V GATTI I SCCTC SS S AGGG G 1 TTGA S AGTTGC O A	AAGA* K GGAGG GCAGGG R TTTAC Y L3 TCAC H -L3	CAGA CAGA CAGA T Y Frai CGIG V CATC M	AGCCAR	CCAACC CCDR TGG W TACIC T ACTC T CTGG W	A VI CAGNO S Frammar Y CAGNO S G	A G GGAG G AACTCCA M - ann TCCA AG C A ACTCCA C P e-L2 AG C A AG C A G C	G GCTATI Y ATTGG A	P GCAT A GCCT. S L GCCT. S L GCCT. S L GCCT. S C GCCT. S Frai	G TCAG F S TAC: T T AAGCA A Fra GGGT G GCAC GCAC TTAC: Y Tne-L	S TAGE N TCTC S MG-H TCAA Q GCAA A CTCC S TCTCC S 4	Q V CDF CTAC Y Y STACE Y 14 6 GAAA GCCCA P TCACC L T	Q 2-H1 CTGG W AATTO N ACTCC CCTCC CCTC CCTCC CCTCC CCTC CCT	L SATO M GGA G A AGIX V GGAG E EATG X AGIX S AGIX AGIX S AGIX AGIX AGIX AGIX AGIX AGIX AGIX AGI	AAGC CACC G	Q CTGC W FTTC F TTAT Y CGTC V TTAT Y ATGG	S GGIG V LAAC K TTCT F TCCC S ACC T T C C C C C C C C C C	Frammanacc K GGGTTG G C A TCAG M T T CTGA A E kapp	HE-H: PARAMA CAAC CAAC CCCA CCCCA C	E L 2 2 GGC R GGC A GAC R GGC A GGC
968 314) 1051 342) 1142 372) 1226 400) 1316 430)	VH GGTG V CTGG P G ACTC T CAAC T T GGGA ACTG S ACTG L TGCC	ant	i-CD CCTGC P (GCTX G TGCL AAC K H-L1 CCTC S	19 SETCH SET	S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	GTGF V GATT I I	AAGAY KCAGGAY GCAGGAY CCAGGAY R TTATY Y L3 TCAC H L3 TGGG	CACA T Y Frai CGIG V ATT M F AGT	AGCCA AGCCA Y Me-l CTA N AGCCA R	CAAC CDR TGG W TACI Y CTAY CTAY CTAY CTGG W CTAY CTGG CTGG	A VI CACA Y CACACA Y CACACACA	A G GGAG G AACTCCA M - ann TCCA AGC A Q Q Q GTCTT S	G GCTATI Y ATTGG ATTGG ATTGG S AGCA A GCAA K GCAA GCAA GCAA GCAA GCAA	P GCAT A GCCT. S L GCCT. S L GCCT. S C GCCT. S	G TCAG F S TAC: T A AGCA A Fra GGGT S GCAC GCAC GCAC TTAC: Y TTAC: TTCGC	S TAGE ITAGE	Q V CDF CTAC Y Y TTAC Y Y SEACCH B II H4 GGAA G ' TCTCC P TCAC TCAC CAAA	Q Q RH1 W AATTC N ACTC: CTCC CCTC CCTC CCTC CCTC CCTC CCT	L ATC GGA GGA AGTX V CCGAG E AGGA CAGGA C	AAAG K CACC T TAAAG K GAT I GGGCA	Q CTCC W FTTAT Y CGTC V TTAT Y ATGG M AACQ	S GGIG V LAAC K F TICCI S ACCA T D LAGGE E CCGGGG	Frammarkov K GGGT GGGT GTCAG S TCAG TCAG T T CTCAA A E kapp	HE-H: PAGA CAACA CAACA A I COCCA A COCCA A TOCCA S S AAGA	L 2 2 GGC R GGC A GAC R GGC A
968 314) 1051 342) 1142 372) 1226 400) 1316 430) 1401 458)	VH GGTG V CTGG P G ACTC T CAAC T T GGGA ACTG S ACTG L TGCC	ant	i-CD CCTGC P (GCTX G TGCL AAC K H-L1 CCTC S	19 SETCH SET	S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	GTGF V GATT I I-H3 S S AGGG G I I-TGA S S ame- TGC O DR CDR	AAGAY K CGGAY G CCAGG R TATY Y L3 TCAC H L3 TGG W	CACA T CACA T Frai CGIC V TTTC M TTTC F AGT	AGCCA AGCCA Y Me-l CTA N AGCCA R	CAAC CDR TGG W TACI Y CTAY CTAY CTAY CTGG W CTAY CTGG CTGG	A VI CACA Y CACACA Y CACACACA	A G GGAG G AACTCCA M - ann TCCA AGC A Q Q Q GTCTT S	G GCTATI Y ATTGG A	P GCAT A GCCT. S L GCCT. S L GCCT. S C GCCT. S	G TCAG F S TAC: T A AGCA A Fra GGGT S GCAC GCAC GCAC TTAC: Y TTAC: TTCGC	STAGE STAGE NO TOTAL	Q V CDF CTAC Y Y TTAC Y Y SEACCH B II H4 GGAA G ' TCTCC P TCAC TCAC CAAA	Q Q RH1 W AATTC N ACTC C C C C C C C C C C C C C C C C C	L ATC GGA GGA AGTX V CCGAG E AGGA CAGGA C	AAAG K CACC T TAAAG K GAT I GGGCA	Q CTCC W FTTAT Y CGTC V TTAT Y ATGG M AACQ	S SGIG V EAACO K TTCT S ACCO T T C C C C C C C C C C C C C C C C	Frammarkov K GGGT GGGT GTCAG S TCAG TCAG T T CTCAA A E kapp	HE-H: PAGA CAACA CAACA A I COCCA A COCCA A TOCCA S S AAGA	L 2 2 GGC R GGC A GAC R GGC A
968 314) 1051 342) 1142 372) 1226 400) 1316 430) 1401 458)	VH GGTG V CTGG P G ACTC T CAAC T T GTGG S A CTGG A T T GTGG A T T T T T T T T T T T T	ant ances and ances and ances	i-CD CCTGC P (GGTYC G G TGC/A R-H3 TTAC K R-H3 CTC S H-L1 CTC S S TCT S	19 SETCHEL L GAGACC T L AAAG S GGAG GACT C AAAG C C C C C C C C C C C C C	S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	GTGF V GATTI I = H3 CCTC S S S AGGC G 1 TTGA S AME TTGC CDR CCAG Q	AAGAY K CAGAGA G G CCAGAGA R TATACA Y L L 3 TCAGA H L L 3 TGGG W epitt	TTTC CAGA CACA T Frain CGTC V CATT AGT S Ope	ATTA AGCC A TTA Y Me-l CTC L AGCC R AGCC R	CAAC K CDR TGG W TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TA	ATGCI PATGCI PATGCI A VI CAGTX Q S FRAM TACCY Y GTGG S G	A G GGAG GGAG G AACTCCA ACTCCA ACTCCA ACTCCA ACTCCA ACTCCA ACTCCA ACCCA	G GCTAT ; Y ATGC ATGC S GCAA A GAAGG GGAA GGAAG GGAAG T T I	P GCAT A GCCT S L ACTC Y W TCACT C C C C C C C C C C C C C C C C C	G TCAG F S TAGCA A A Fra GGGT S GGTCT S TTACT Y TTACT TTACT S TTACT S	S ETAGE N TICTY S me-l- TICAA Q GCAN A CTCC S 4 GGGA GGGA F	Q V CDF CTAC Y Y Y TTAC Y B II GGAAA TCAC P TCAC P TCAC L T CAAAA TI K Hilis6 It	Q 2-H1 ETGG W AATT N ACTC: CCTCC T S CAGGC K F AAATC I GTTG L ail	EATGOOD AAGTY WAGGE SAAAGE EGAAAGE	AAAG K CACC T CACC K GAT I	Q CTGC W FTAT Y CGTC V TTAT Y ATGG M AAACQ N Xbs	S CONTROL OF THE CONT	Frammarkov K GGGT GGGT GTCAG S TCAG TCAG T T CTCAA A E kapp	HE-H: PAGA CAACA CAACA A I COCCA A COCCA A TOCCA S S AAGA	L 2 2 GGC R GGC A GAC R GGC A

DE 198 19 846 A1 C 07 K 16/00

Offenlegungstag:

11. November 1999

VH anti-CD3

1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT

98 G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

DE 198 19 846 A1 C 07 K 16/00

Offenlegungstag:

11. November 1999

941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC

1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAACGGGATTTCGATG
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDl

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT 50▶V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

EcoRI

Xhol

1163 GCTAAAGAAGAAGAGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG
75 A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

VH anti-CD3

1235 CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
99 Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8